



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C12N 15/00, 15/85, 15/18 C12N 5/10, A01K 67/027 C12N 15/12, C07K 15/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/22644 (43) Date de publication internationale: 23 décembre 1992 (23.12.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00533		(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kleber, F-75116 Paris (FR).
(22) Date de dépôt international: 12 juin 1992 (12.06.92)		
(30) Données relatives à la priorité: 91/07179 12 juin 1991 (12.06.91) FR		(81) Etats désignés: CA, JP, US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (FR/FR); 145, rue de l'Université, F-75341 Paris Cedex 07 (FR).		
(72) Inventeur; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): HOUBEDINE, Louis-Marie (FR/FR); 9 bis, rue du Haras, F-78530 Buc (FR). DEVINOY, Eve (FR/FR); 73 ter, rue G.-Vatonne, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR). THEPOT, Dominique (FR/FR); 19, allée des Bosquets, F-93193 Livry-Gargan (FR).		

(54) Title: PRODUCTION OF A PROTEIN OF INTEREST IN THE MILK OF A TRANSGENIC MAMMELIAN

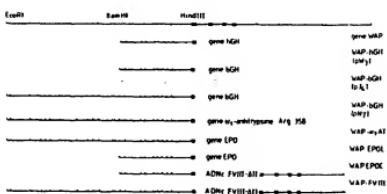
(54) Titre: PRODUCTION D'UNE PROTEINE D'INTERET DANS LE LAIT D'UN MAMMIFERE TRANSGENIQUE

(57) Abstract

The present invention relates to a method for the preparation of a heterologous protein of interest in mature form or fused in the milk of a mammalian female, method wherein: said female is bred and the milk is collected and said protein is recovered from the milk and separated if necessary, the method being characterized in that said female is a transgenic animal in the genome of which has been integrated a sequence coding for said protein of interest under the control of at least one sequence present amongst the elements of expression of the rabbit WAP protein and situated on the fragment having a length of at least 3 Kb from the extremity 3' of the complete WAP promoter. The invention also relates to the milk product obtained and to a eukaryotic cell having the integrated sequences disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un procédé de préparation d'une protéine hétérologue d'intérêt sous forme mature ou sous forme fusionnée dans le lait d'une femelle de mammifère, procédé dans lequel: on élève ladite femelle et, on récupère le lait d'où l'on récupère ladite protéine que l'on sépare si nécessaire, caractérisé en ce que ladite femelle est un animal transgénique dans le génome duquel a été intégrée une séquence codante pour ladite protéine d'intérêt sous le contrôle d'au moins une séquence figurant parmi les éléments d'expression de la protéine WAP de lapin et se trouvant sur le fragment d'une longueur d'au moins 3 Kb à partir de l'extrémité 3' du promoteur WAP complet. Elle a également pour objet le produit du lait obtenu et une cellule eukaryote ayant intégré les séquences décrites.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	MI.	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IE	Irlande	RO	Roumanie
CA	Canada	IT	Italie	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SM	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Lithuanie	SU	Union soviétique
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

1
PRODUCTION D'UNE PROTEINE D'INTERET DANS LE LAIT D'UN MAMMIFERE TRANSGENIQUE

La présente invention concerne un procédé de préparation d'une protéine d'intérêt dans le lait d'un animal transgénique. Elle concerne également les constructions permettant d'obtenir ces animaux, les animaux obtenus ainsi que les cellules contenant les constructions permettant 5 l'expression d'une protéine hétérologue.

Plusieurs voies ont été poursuivies pour obtenir des protéines présentant un intérêt biologique, thérapeutique, ou industriel, et produites naturellement en petites quantités ou sous une forme difficile à purifier.

Des protéines ont ainsi pu être produites grâce à des 10 techniques de recombinaison génétique, par des microorganismes, comme des bactéries ou des levures. Cependant, la plupart des protéines requièrent, après leur synthèse, un stade de maturation consistant en modifications chimiques de certains groupements réactionnels, glycosylation, etc. Les cellules procaryotes ne disposent pas de l'équipement 15 enzymatique adéquat pour effectuer cette maturation, d'où l'obtention de protéines inactives et/ou à fort pouvoir antigénique.

Il est donc préférable de synthétiser ces protéines dans des cellules eucaryotes, qui réaliseront les transformations enzymatiques appropriées. Cependant, la culture à grande échelle de cellules tissulaires pose un 20 certain nombre de difficultés techniques et économiques.

Une autre approche consiste donc à faire produire ces protéines par des cellules *in vivo*, par l'intermédiaire d'animaux transgéniques. Il est souhaitable que le système utilisé permette la production de protéines en grande quantité, et facilement récupérable. Il est donc 25 intéressant que la protéine recombinante soit produite au niveau de la glande mammaire d'animaux transgéniques, et excrétée dans le lait. Il s'agit en effet d'un fluide biologique aisément collectable, ayant une complexité relativement limitée et une faible activité protéolytique : en outre, les processus de maturation des protéines recombinantes seront 30 probablement assurés (glycosylation, phosphorylation, clivage, etc.).

On a ainsi réussi à faire synthétiser par la glande mammaire de souris ou de brebis des protéines du lait d'une autre espèce ou des protéines normalement absentes du lait (Réf. 1 à 15).

· Toutefois, le taux de protéines ainsi produites est extrêmement variable. Il est différent d'un animal transgénique à l'autre, dans la mesure où il est fonction du processus d'intégration du transgène qui est lui-même variable d'un animal à l'autre. La nature des constructions de gène est également essentielle, les éléments régulant l'expression des gènes des protéines du lait pouvant être multiples et situés en divers points de la région promotrice et de la partie transcrive du gène. Ainsi, les promoteurs de la bêta-lactoglobuline ovine, de la WAP de rat et de la caséine-béta de rat sont capables de faire synthétiser ces protéines chez des souris transgéniques. Les taux ne sont toutefois systématiquement élevés que dans le cas de la bêta-lactoglobuline. De même, le promoteur de la bêta-lactoglobuline dirige la synthèse de l'alpha₁-antitrypsine humaine qui atteint la valeur de 7 mg/ml de lait dans le lait d'une souris transgénique. Le promoteur de la caséine-alpha_{S1} permet la synthèse de l'urokinase humaine, mais les promoteurs des gènes de la caséine-béta de rat et de la caséine-béta de lapin utilisés jusqu'à ce jour, sont d'une activité limitée. Le promoteur du gène de la WAP de souris dirige la synthèse de plusieurs protéines étrangères (activateur de plasminogène, CD4) qui sont sécrétées dans le lait de souris transgéniques. Les quantités de protéines obtenues avec ce promoteur sont toutefois relativement modestes.

De plus, il arrive que la spécificité du promoteur soit modifiée par son association à un gène étranger. C'est ainsi que Günzburg et al. (Molecular Endocrinology 1991) obtiennent la sécrétion d'hormone de croissance à l'aide d'un ADN recombinant sous la dépendance du promoteur de la WAP de souris, chez des animaux transgéniques ; mais l'hormone de croissance est alors également produite dans le cervelet, dans les cellules gliales de Bergman. De tels phénomènes peuvent résulter dans une toxicité et dans la mort prématuée de l'animal.

La présente invention repose sur la mise en évidence de l'intérêt particulier du promoteur du gène de la WAP de lapin. En effet, la WAP de lapin ("whey acidic protein") est une protéine relativement abondante du lait de lapin (15 mg/ml de lait), et le lapin est potentiellement un animal transgénique utilisable à grande échelle.

La présente invention concerne un procédé de préparation d'une protéine hétérologue d'intérêt sous forme mature ou sous forme fusionnée dans le lait d'une femelle de mammifère, procédé dans lequel :

- on élève ladite femelle et,
- on récupère le lait d'où l'on récupère ladite protéine que l'on sépare si nécessaire,

5 caractérisé en ce que ladite femelle est un animal transgénique dans le génome duquel a été intégrée une séquence codant pour ladite protéine d'intérêt sous le contrôle d'au moins une séquence figurant parmi les éléments d'expression de la protéine WAP de lapin et se trouvant sur le fragment d'une longueur d'au moins 3 Kb à partir de l'extrémité 3' du promoteur WAP complet.

10 De préférence, la présente invention concerne un procédé dans lequel la séquence contrôlant l'expression de la protéine d'intérêt comprend en outre des éléments d'expression situés sur le fragment compris entre 3 Kb et 6,3 Kb à partir de l'extrémité 3' du promoteur WAP.

15 L'obtention d'animaux transgéniques est connue et a été largement décrite avec des constructions voisines dans les documents cités précédemment mais également dans Günzburg et al., Hennighausen et al., Burdon et al., Reddy et al. ainsi que dans le brevet WO 90 05188.

20 La description détaillée des méthodes de transgénèse ne sera pas rappelée en détail, les documents ci-dessus sont incorporés dans la présente description par référence expresse.

Par "protéine hétérologue d'intérêt", on entend désigner essentiellement une protéine qui n'est pas naturellement sous le contrôle du promoteur WAP de lapin.

25 Dans le procédé selon l'invention, la femelle de mammifère utilisée est de préférence une lapine mais ces constructions sont efficaces également dans d'autres mammifères, par exemple les souris.

Le lait obtenu contient la protéine d'intérêt qui peut être isolée ou non puis, suivant qu'elle est sous forme mature ou fusionnée, elle peut subir une scission chimique ou enzymatique si nécessaire.

30 Les constructions d'ADN utilisées sont de préférence introduites par microinjection au niveau de l'oeuf fécondé au stade une

cellule jusqu'à 8 cellules puis on sélectionne les animaux répondant aux critères décrits précédemment, c'est-à-dire transgéniques et exprimant ladite protéine dans le lait.

La région promotrice de ce gène WAP greffée au gène rapporteur de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) bactérienne contient les éléments sensibles aux deux hormones lactogènes les plus importantes, la prolactine et les glucocorticoïdes. Ces hormones stimulent de manière intense l'expression du gène CAT lorsque le gène hybride est transfecté dans des cellules épithéliales primaires mammaires de lapin. La réponse aux hormones dépend de la longueur du promoteur utilisé. Le promoteur du gène de la WAP de lapin est donc beaucoup plus efficace que les promoteurs des gènes de la WAP de souris et de rat, utilisés jusqu'à ce jour.

En particulier, dans le procédé selon la présente invention, la séquence codant pour la protéine d'intérêt peut être précédée vers son extrémité 5', d'une séquence correspondant au promoteur du gène WAP de lapin complet, ou d'une séquence équivalente, assurant la fonction de promoteur. Il est même possible, dans ce cas, d'utiliser la totalité du gène WAP et un promoteur WAP dudit gène ou d'une séquence équivalente. La figure 5 annexée à la présente demande représente le dit gène WAP de lapin.

Par "séquence équivalente", on entend désigner de préférence une séquence ayant au moins une longueur de 3 Kb à partir de l'extrémité 3' du promoteur WAP et en particulier comportant les éléments d'expression situés sur le fragment d'une longueur d'au moins 6,3 Kb à partir de l'extrémité 3' du promoteur WAP de lapin complet, notamment située entre les sites HindIII et BamHI (figure 1).

Le promoteur peut comporter une séquence de 17 Kb, comprise entre les sites HindIII et EcoRI, ou une séquence comportant les éléments d'expression situés sur ce fragment. Les éléments essentiels des constructions selon l'invention se trouvent sur le fragment d'une longueur de 17,6 Kb à partir de l'extrémité 3' du promoteur.

Ce long promoteur est susceptible d'apporter des éléments qui favorisent encore l'expression du gène étranger qui lui est lié, ou de rendre son expression plus régulièrement élevée en la rendant plus indépendante du site d'insertion du transgène dans le génome.

5 Le promoteur court de 6,3 Kb donnera une réponse aux hormones lactogènes pratiquement identique à celle obtenue avec le promoteur long de 17 Kb, et peut diriger la synthèse de protéines dont les gènes lui sont associés dans un vecteur à des taux très élevés.

10 L'invention concerne également des constructions telles que définies ci-dessus mais dans lesquelles, dans la séquence correspondant au gène de la protéine WAP de lapin, le codon AUG initiateur est déleté.

Cette modification peut être obtenue notamment par mutagénèse dirigée.

15 Lorsque la séquence codant pour la protéine d'intérêt est sous forme fusionnée avec la séquence de tout ou partie du gène WAP, il est possible de supprimer la séquence ATG de cette protéine.

La protéine WAP de lapin pourra ainsi, avec ce type de construction, être exprimée par exemple chez des souris transgéniques.

20 Dans ce type de construction comprenant le gène de la protéine WAP de lapin, ayant éventuellement perdu le codon AUG initiateur, le gène ou l'ADN_C de la protéine d'intérêt peut être placé en différents sites qui pourront conduire à des niveaux et des types de constructions différents, comme cela ressortira des exemples.

25 Selon un autre de ses aspects, la présente invention fournit un procédé pour récupérer le lait produit par une femelle de mammifère et la protéine qu'il contient, caractérisé en ce que, pour récupérer la protéine d'intérêt dans le lait de ladite femelle de mammifère,

- a) on recueille les glandes mammaires,
- b) on laisse incuber les glandes mammaires à une température d'environ 30 0°C pendant une durée variant de deux heures à 18 heures,
- c) on récupère le lait ayant spontanément exsudé des glandes,
- d) on isole la protéine d'intérêt à partir du lait et on obtient ladite protéine purifiée.

5 Ce procédé a été mis au point dans le cadre de la production de protéine hétérologue par un animal transgénique ayant intégré dans son génome des fragments du gène de la protéine WAP, mais il peut être appliqué à la purification de toute protéine que l'on désire isoler du lait.

10 5 Il représente un avantage considérable par rapport aux procédés classiques de traite des mammifères non-ruminants, sur le plan des quantités obtenues, surtout pour des petits animaux comme la souris (24). La composition du lait recueilli est identique à celle du lait produit naturellement. Ce procédé permet en outre un transfert plus aisés des 15 produits obtenus du lieu de production au lieu de purification et de traitement, par transport des glandes mammaires dans de la glace.

15 10 Le procédé de préparation de protéine hétérologue de la présente invention, selon l'une quelconque de ses variantes, permet d'obtenir un grand nombre de protéines. Parmi ces protéines, il faut citer :

15 - les facteurs de croissance,
- les interleukines,
- les facteurs de stimulation,
- les kinases,
- les facteurs de coagulation,
20 - l'alpha-antitrypsine,
- l'hirudine.

et en particulier :

25 - l'érythropoïétine,
- le G-CSF,
- l'alpha-antitrypsine,
- l'urokinase,
- le facteur VIII.

On peut citer les constructions suivantes :

30 - construction WAP-alpha₁-antitrypsine humaine (anologue Arg 358) : le gène entier alpha₁-antitrypsine humaine ayant l'Arg 358 à la place de la Meth 358 (Courtney, Bull. Inst. Pasteur (1988) 86, 85-94) a été fusionné au promoteur long (17,6 Kb) du gène de la WAP de

lapin au site Hind III de la séquence 5'P non traduite, sur le modèle des constructions WAP-GH. Plusieurs lignées de souris expriment le gène humain à la concentration de 2 et 5 mg/ml de lait.

- construction WAP-érythropoïétine humaine : le gène

5 entier de l'érythropoïétine humaine (Semenza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86, 2301-2305) est fusionné au promoteur (6,3 Kb et 17,6 Kb) du gène de la WAP de lapin.

- construction WAP-facteur VIII-deltaII humain : l'ADNC

10 du facteur VIII-deltaII humain (délété de la région B [Meulien et al., Prot. Engin (1988) 2, 301-306]) précédé du premier intron du gène du facteur VIII et dépourvu de sa séquence de polyadénylation, a été introduit à l'intérieur du gène WAP de lapin entier au site Hind III introduit par mutagénèse dirigée et qui précède l'AUG naturel.

15 Les constructions selon l'invention permettent d'obtenir des résultats tout à fait inattendus, notamment le promoteur de 6,3 Kb de la WAP associé aux gènes de l'hormone de croissance humaine et bovine est capable de diriger la synthèse de ces protéines dans le lait de souris transgéniques à des taux très élevés (1-21 mg/ml).

20 L'hGH contenue dans le lait des souris transgéniques est structuralement intacte. L'hGH a également conservé son activité biologique (évaluée non par son activité hormone de croissance mais par son activité prolactine). Le test biologique indique que la concentration de l'hormone est de 10 mg/ml, une valeur en accord avec les valeurs trouvées par le test radioimmunologique et par l'électrophorèse.

25 Le promoteur du gène de la WAP de lapin est donc beaucoup plus efficace que les promoteurs des gènes de la WAP de souris et de rat, utilisés jusqu'à ce jour.

30 Le tableau I suivant donne un résumé des résultats des publications 2 à 15 et met donc en valeur les résultats obtenus avec les constructions selon l'invention, par rapport à ceux publiés dans l'art antérieur.

5

10

15

20

25

30

Promoteur utilisé	Protéine codée	Animal utilisé	Nombre d'animaux exprimant la protéine dans le lait	Concentration de la protéine dans le lait en microgramme/ml
Caséine alpha bovine	Urokinase humaine	Souris	1 sur 3	1000
Caséine beta de lapin	Interfétine 2 humaine	Lapin	4 sur 4	0,001 à 0,01
Lactoglobuline beta ovine	Facteur IX humain de coagulation	Brebis	2 sur 2	0,01
Lactoglobuline beta bovine	Antitrypsine alpha 1 humaine	Brebis Souris	2 sur 2 7 sur 13	5 à 7000
WAP de souris	cDNA humain	Souris	5 sur 7	0,4
WAP de souris	cDNA humain	Souris	4 sur 6	0,08 à 30
WAP de souris	Protéine PS2	Souris	1 sur 1	1,5
WAP de souris	GH humaine	Souris	8 sur 8	1000
WAP court de lapin	GH humaine	Souris	6 sur 6	5 à 21000
WAP court de lapin	GH bovine	Souris	8 sur 8	1200 à 16700
WAP long de lapin	GH bovine	Souris	4 sur 4	87 à 6900

35

Tableau 1 : récapitulatif des différentes protéines recombinantes exprimées dans le lait d'animaux transgéniques.

Une des raisons essentielles peut tenir dans le fait que le fragment d'ADN de lapin (6,3 Kb) était beaucoup plus long que son homologue de souris et de rat (2,6 Kb et 0,9 Kb). Des éléments régulateurs essentiels peuvent manquer dans les fragments d'ADN de souris et de rat utilisés.

La présente invention concerne également des constructions permettant d'obtenir des animaux transgéniques selon l'invention.

La présente invention concerne notamment les séquences d'ADN et les vecteurs permettant la mise en oeuvre du procédé ; en particulier les séquences d'ADN comportant au moins un gène hétérologue codant pour une protéine d'intérêt, sous le contrôle d'au moins une séquence figurant parmi les éléments d'expression de la protéine WAP de lapin et se trouvant sur le fragment d'une longueur d'au moins 3 Kb à partir de l'extrémité 3' du promoteur WAP complet.

La présente invention concerne également des animaux transgéniques utilisables dans le procédé selon la présente invention, ainsi que des cellules transformées contenant les constructions selon l'invention.

Bien que les animaux en cause puissent être très divers, le lapin est un animal potentiellement utilisable pour obtenir des protéines recombinantes en abondance. Jusqu'à 100 ml de lait peuvent être collectés chaque jour. Ce lait est très riche en protéines (beaucoup plus riche que le lait des ruminants). Il est par ailleurs plus facile et moins onéreux d'obtenir des lapins que des gros animaux transgéniques. Le promoteur du gène de la WAP de lapin a, de plus, toutes les chances de diriger au mieux la synthèse de protéines recombinantes chez le lapin.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après dans lesquels on se référera aux figures suivantes :

FIGURE 1 : cartographie du gène de la WAP de lapin.

FIGURE 2a: schéma de la construction du plasmide pW₃.

FIGURE 2b: polylinker du plasmide p-polyIII-1

FIGURE 3 : schéma de la construction du plasmide pJ₄.

FIGURE 4 : production d'hormone de croissance humaine et bovine dans des lignées de souris transgéniques abritant les constructions pW₃ et pJ₄.

FIGURE 5 : séquence du gène WAP de lapin.

5 FIGURE 6 : schémas des différentes constructions utilisées *in vivo*.

FIGURE 7 : schémas des constructions contenant le gène rapporteur CAT et des longueurs variables du promoteur WAP.

FIGURE 8 : efficacité des constructions décrites dans la figure 7.

10 **EXEMPLE 1 : CONSTRUCTION DU PLASMIDE pW3**

On prépare tout d'abord le plasmide p26C.

Le plasmide p26C a été obtenu en introduisant la séquence Bam H₁-Hind III du gène WAP (fragment 6,3 Kb de la Fig. 1) dans le poly linker du vecteur p-poly III-I (entre les sites Bam H₁ et Hind III).

15 Au cours de ce clonage, le site Bam H₁ a été supprimé et remplacé par le site Cla I qui figure dans le vecteur p26C (Fig.2). Le vecteur p26C est donc un plasmide capable de recevoir un gène étranger placé sous la dépendance du promoteur WAP 6,3 Kb. L'introduction du gène étranger peut se faire par exemple dans le site Sal I du poly linker (Fig.2).

20 Les inserts contenant la totalité du promoteur et des gènes étrangers peuvent être isolés du plasmide après une coupure aux deux sites Not I qui sont aux extrémités du poly linker du plasmide p-poly III-I.

Le plasmide pW₃, obtenu à partir du plasmide p26C (selon la figure 2), contient le promoteur du gène de la WAP de lapin (6,3 Kb) et le gène de l'hormone de croissance humaine (hGH). Le fragment utilisé pour obtenir les souris transgéniques est compris entre les deux sites NotI.

25 Un site Hind III a été introduit dans la séquence de tête du gène (leader) par mutagénèse dirigée pour servir de site de clonage.

30 **EXEMPLE 2 : CONSTRUCTION DU PLASMIDE pJ4**

Le plasmide pJ₄, obtenu à partir du plasmide p26 (selon la figure 3), contient le promoteur du gène de la WAP de lapin (6,3 Kb) et le

gène de l'hormone de croissance bovine (bGH). Le fragment utilisé pour obtenir les souris transgéniques est compris entre les deux sites NotI.

La souche d'E. Coli contenant le plasmide p26 a été déposée le 12 juin 5
1991, sous le n° I-1116 à la collection nationale de culture de microorganismes de l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS
CEDEX 15.

EXEMPLE 3 : OBTENTION DE SOURIS TRANSGENIQUES

10

Les fragments pW₃ et pJ₄ ont été utilisés pour obtenir des animaux transgéniques. Les souris transgéniques ont été obtenues par la technique classique de microinjection (Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 4438-4442). 1-2-pl contenant 500 copies du gène ont été injectés dans le pronucleus mâle d'embryons de souris. Les constructions ont été réalisées dans le vecteur p-poly III-I (Lathe et al., Gene (1987) 57, 193-201). Les fragments Not I - Not I de ce vecteur contenant les gènes recombinés ont été microinjectés. Les embryons ont ensuite été transférés dans l'oviducte de femelles adoptives hormonalement préparées. Environ 15 20 10% des embryons manipulés ont donné naissance à des souriceaux et 2-5 % des embryons manipulés à des souriceaux transgéniques. La présence des transgènes a été révélée par la technique de transfert de Southern à partir de l'ADN extrait des queues des souris. Les concentrations de l'hormone de croissance dans le sang et dans le lait des animaux ont été évaluées à 25 l'aide de tests radioimmunologiques spécifiques.

L'activité biologique de l'hGH a été évaluée en ajoutant du lait au milieu de culture de cellules ou d'explants mammaires de lapin. L'hGH contenue dans le lait a induit l'expression du gène de la caséine- β évaluée par la mesure des ARNm et de la protéine.

30

35

EXEMPLE 4 : PRODUCTION D'HORMONE DE CROISSANCE HUMAINE
OU BOVINE DANS LE LAIT DE SOURIS TRANSGENIQUES
AYANT INCORPORE LES CONSTRUCTIONS pW3 ET pJ4

5 Les concentrations d'hormones ont été déterminées par des tests radioimmunologiques spécifiques.

10 L'identification de l'hGH dans le lait d'une souris transgénique est réalisée de la façon suivante. Le lait de souris est centrifugé à 150.000g pendant une heure pour sédimenter les micelles de caséine. Le surnageant (1 µl par puits) a été récupéré et examiné par une électrophorèse en gel de 15 polyacrylamide, en présence d'hormone de croissance humaine témoin et d'un lait contrôle. Les résultats sont rapportés sur la figure 4.

15 Les animaux ayant intégré la construction pW₃ donnent des concentrations d'hGH de l'ordre de 10 mg/ml de lait et peuvent atteindre 21 mg/ml.

Les animaux ayant intégré la construction pJ₄ produisent de l'ordre de 5 mg/ml de lait de bGH et jusqu'à 17 mg/ml.

20 Le procédé selon la présente invention permet de récolter 1,5 ml de lait/glande mammaire de souris (en mettant la glande mammaire dans la glace). 200 souris allaitantes exprimant une protéine étrangère à la concentration de 3 - 5 mg/ml fournissent donc 1 g de la protéine brute.

EXEMPLE 5 : CONSTRUCTIONS DE GENE

25 Les constructions des gènes utilisés pour exprimer des protéines recombinantes dans le lait d'animaux transgéniques contiennent dans tous les cas la région régulatrice du gène WAP de lapin : fragment BamHI-HindIII (6,3 Kb) ou fragment EcoRI-HindIII (17,6 Kb). Les plasmides WAP-hGH, WAP bGH, WAP α -AT, et WAP-EPO contiennent respectivement 30 les gènes entiers (séquence de tête, exons, introns et terminateur de transcription) de l'hormone de croissance humaine (hGH), de l'hormone de

croissance bovine (bGH), de l' α_1 -antitrypsine humaine mutée en Arg358 et d'érythropoïtine humaine. Dans ces constructions les gènes ont été associés à la région régulatrice du gène WAP au site HindIII. La construction WAP-FVIII-ΔII contient l'ADNC du facteur VIII humain dans sa forme Δ II précédée d'un intron du gène du facteur VIII humain. Cet ensemble intron-ADNC a été introduit dans le site HindIII du gène WAP de lapin entier (figure 6).

10 EXEMPLE 6 : IDENTIFICATION DE L'ACTIVITE DE LA REGION REGU-
LATRICE DU GENE WAP DE LAPIN IN VITRO

Des longueurs variables de la région située en amont du site d'initiation de la transcription du gène WAP ont été associées à un gène rapporteur (le gène CAT : chloramphenicol acetyl transferase) (figure 7). 15 Ces constructions ont été introduites dans des cellules épithéliales mammaires cultivées sur un gel de collagène I de queue de rat par une transfection à l'aide de lipofectine. Les cellules ont ensuite été maintenues pendant trois jours en présence d'hormones (insuline, cortisol, prolactine). L'enzyme a alors été mesurée dans les extraits cellulaires. Les constructions ne contenant que 1806 pb ou moins de la région régulatrice n'expriment pas le gène CAT. La construction contenant 3000 bp est faiblement active, tandis que les constructions contenant 6300 et 17600 bp sont franchement exprimées en présence des hormones. La prolactine seule exerce un rôle inducteur faible mais significatif sur le gène CAT. L'insuline et surtout le cortisol, inactifs seuls, amplifient l'action de la prolactine. La sensibilité du gène vis-à-vis des hormones est exactement identique à celle du gène WAP endogène des cellules. Les régions -3000-1806 bp et -6300-3000 bp contiennent donc des éléments régulateurs essentiels pour que le gène WAP s'exprime de manière intense (figure 8). Le fragment 20 17600-6300 bp n'apporte pas de stimulation supplémentaire in vitro ce qui n'exclut pas qu'il puisse avoir une telle action in vitro chez les animaux transgéniques. Ces expériences révèlent pour la première fois l'activité des régions régulatrices du gène WAP in vitro par des transfections des cellules.

REFERENCES

1. VAN BRUNT J. Biotechnology (1988) 6, 1149-1154
2. SIMONS J.P. et al. Nature (1987) 328, 530-532
- 5 3. SIMONS J.P. et al. Biotechnology (1988) 6, 179-183
4. CLARK A.J. Biotechnology (1989) 7, 487-492
5. ARCHIBALD A.L. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87, 5178-5182
6. HARRIS et al. J. Reprod. Fert. (1990) 88, 707-715
- 10 7. GORDON K. et al. Biotechnology (1987) 5, 1183-1187
8. PITTIUS C.W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5874-5878
9. PITTIUS C.W. et al. Mol. Endocr. (1988) 2, 1027-1032
10. YU S.H. et al. Mol. Biol. Med. (1989) 6, 255-261
11. LEE K.F. Nucleic Acids Res. (1989) 16, 1027-1040
- 15 12. MEADE H. Biotechnology (1990) 8, 443-446
13. BUHLER T.A. Biotechnology (1990) 8, 140-143
14. VILOTTE J.L. Em. J. Biochem. (1989) 186, 43-48
15. BAYNA E.M. et al. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 2977-2985
16. LEE K.F. et al. Mol. Cell Biol. (1989) 9, 560-565
- 20 17. GRABOWSKI H. et al. (Soumis à publication)
18. DEVINOY E. et al. Nucleic Acids Res. (1988) 16, 11814
19. THEPOT D. et al. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 3641
20. GUNZBURG W.H. et al. Molecular Endocrinology (1991). A Mammary-specific Promoter Directs Expression of Growth Hormone not only to the Mammary Gland, but also to Bergman Glia cells in Transgenic Mice.
- 25 21. HENNIGHAUSEN L. Protein Expression and Purification (1990) 1, 3-8
22. BURDON T. et al. Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development: Evidence for different mechanisms of regulation during pregnancy and lactation
- 30 23. REDDY B.V. et al. Human Growth Hormone Expression in Transgenic Mouse Milk, abstract in Transgenes, Development and Disease. p212
24. MASCHIO A. et al. (1991) Biochem. J. 275 454-467

LEGENDE RELATIVE AUX FIGURES5 FIGURE 6 :

Les constructions utilisées pour obtenir l'expression de protéines recombinantes dans le lait d'animaux transgéniques.

10

FIGURE 7 :

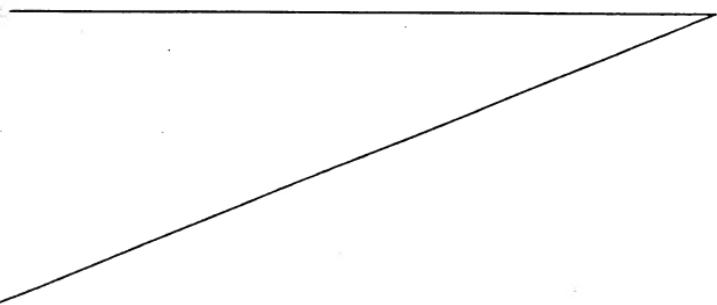
Schéma des différentes constructions comportant le gène CAT placé sous la dépendance de longueurs variables du gène de la WAP de lapin.

15

FIGURE 8 :

Représentation de la variation de l'activité CAT dans des extraits de cellules épithéliales primaires mammaires de lapin transfectées par différents plasmides.

25



30

35

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'une protéine hétérologue d'intérêt sous forme mature ou sous forme fusionnée dans le lait d'une femelle de 5 mammifère, procédé dans lequel :

- on élève ladite femelle et,
- on récupère le lait d'où l'on récupère ladite protéine que l'on sépare si nécessaire,

10 caractérisé en ce que ladite femelle est un animal transgénique dans le génome duquel a été intégrée une séquence codant pour ladite protéine d'intérêt sous le contrôle d'au moins une séquence figurant parmi les éléments d'expression de la protéine WAP de lapin et se trouvant sur le fragment d'une longueur d'au moins 3 Kb à partir de l'extrémité 3' du promoteur WAP complet.

15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence codant pour ladite protéine hétérologue d'intérêt est sous le contrôle d'une séquence comportant en outre au moins un élément d'expression situé sur le fragment compris entre 3 Kb et 6,3 Kb à partir de l'extrémité 3' du promoteur WAP de lapin complet.

20 3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la séquence codant pour ladite protéine hétérologue d'intérêt est sous le contrôle d'une séquence comprenant tous les éléments d'expression situés sur le fragment d'une longueur de 6,3 Kb à partir de l'extrémité 3' du promoteur WAP de lapin complet.

25 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence du promoteur WAP comporte les éléments d'expression situés sur la séquence de 6,3 Kb comprise entre les sites HindIII et BamHI représentés sur la figure 1.

30 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence codant pour ladite protéine hétérologue d'intérêt est sous le contrôle d'une séquence comprenant tous les éléments d'expression situés sur le fragment d'une longueur de 17 Kb, à partir de l'extrémité 3' du promoteur WAP de lapin complet.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la séquence du promoteur WAP comporte les éléments d'expression situés sur la séquence de 17 Kb, comprise entre les sites HindIII et EcoRI représentés sur la figure 1.

5 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la séquence codant pour ladite protéine d'intérêt est précédée vers son extrémité 5', d'une séquence correspondant au promoteur du gène WAP de lapin complet, ou d'une séquence équivalente assurant la fonction de promoteur.

10 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ladite protéine d'intérêt est précédée de la totalité du gène WAP et du promoteur WAP dudit gène ou d'une séquence équivalente.

15 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que, dans la séquence correspondant au gène de la protéine WAP de lapin, le codon AUG initiateur est déleté.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que dans la séquence correspondant à la séquence codant pour la protéine hétérologue, le codon 'AUG initiateur est déleté.

20 11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que pour récupérer la protéine d'intérêt dans le lait de ladite femelle de mammifère,

- a) on recueille les glandes mammaires,
- b) on laisse incuber les glandes mammaires à une température d'environ 0°C pendant une durée variant de deux heures à 18 heures,
- 25 c) on récupère le lait ayant spontanément exsudé des glandes,
- d) on isole la protéine d'intérêt à partir du lait et on obtient ladite protéine purifiée.

30 12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la séquence codant pour la protéine hétérologue est la séquence codant pour l'hormone de croissance humaine.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la protéine hétérologue est choisie parmi :

- les facteurs de croissance,
- les interleukines,
- les facteurs de stimulation,
- les kinases,
- 5 - les facteurs de coagulation,
- l'alpha-antitrypsine,
- l'hirudine.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la protéine est choisie parmi :

- 10 - l'érythropoïétine,
- le G-CSF,
- l'alpha-antitrypsine,
- l'urokinase
- le facteur VIII.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la séquence codant pour la protéine d'intérêt, est constituée par l'ADNc du facteur VIII- deltaII humain, précédé du premier intron du gène du facteur VIII.

16. Lait ou produit du lait contenant une protéine d'intérêt 20 obtenue par la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 15.

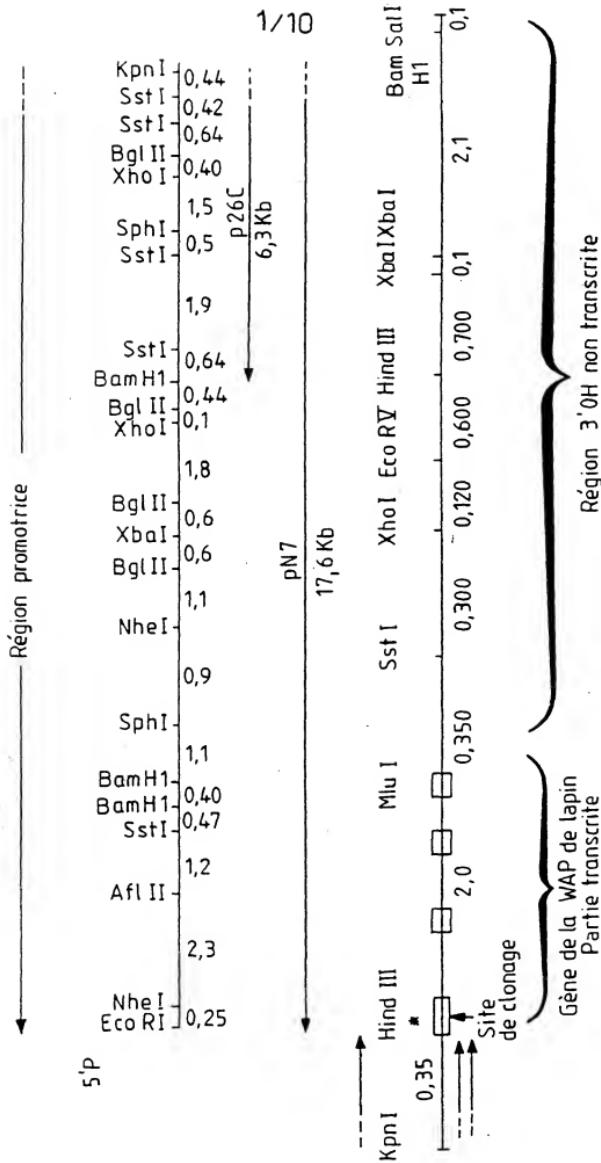
17. Cellule eucaryote, caractérisée en ce qu'elle contient dans son génome une séquence codant pour la protéine d'intérêt hétérologue, sous le contrôle du promoteur WAP de lapin ou d'une séquence équivalente 25 assurant la fonction de promoteur.

18. Cellule eucaryote selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule épithéliale primaire mammaire d'un mammifère femelle.

19. Animal transgénique, caractérisé en ce qu'il renferme des 30 cellules selon l'une des revendications 17 et 18.

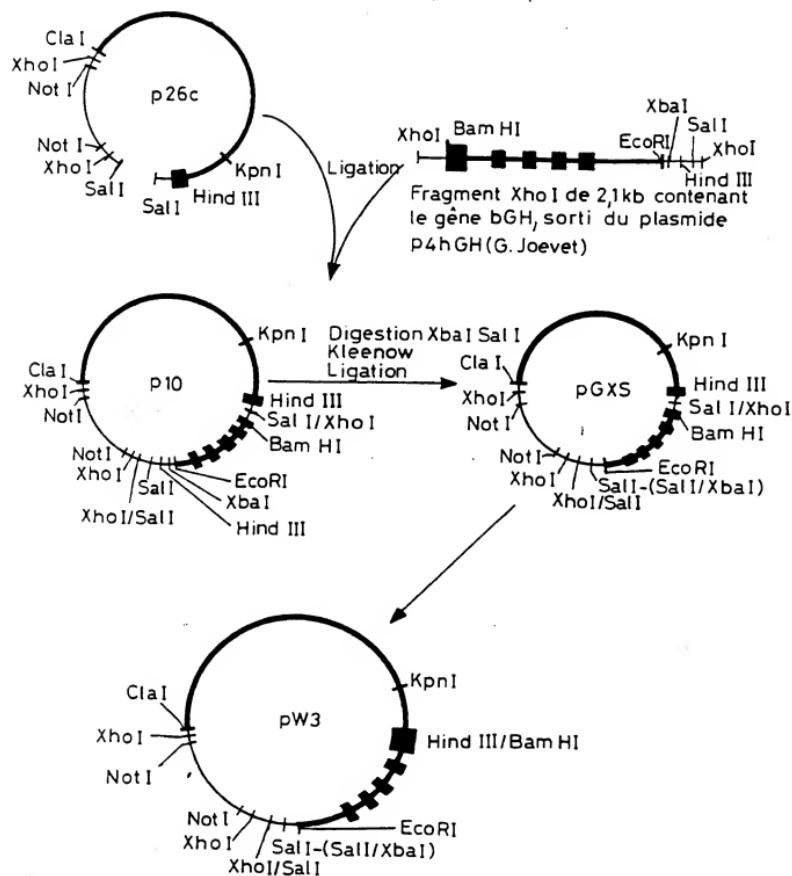
20. Séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un gène hétérologue codant pour une protéine d'intérêt, sous le contrôle d'au moins une séquence figurant parmi les éléments d'expression de la protéine WAP de lapin et se trouvant sur le fragment d'une longueur 35 d'au moins 3 Kb à partir de l'extrémité 3' du promoteur WAP complet.

FIG-1

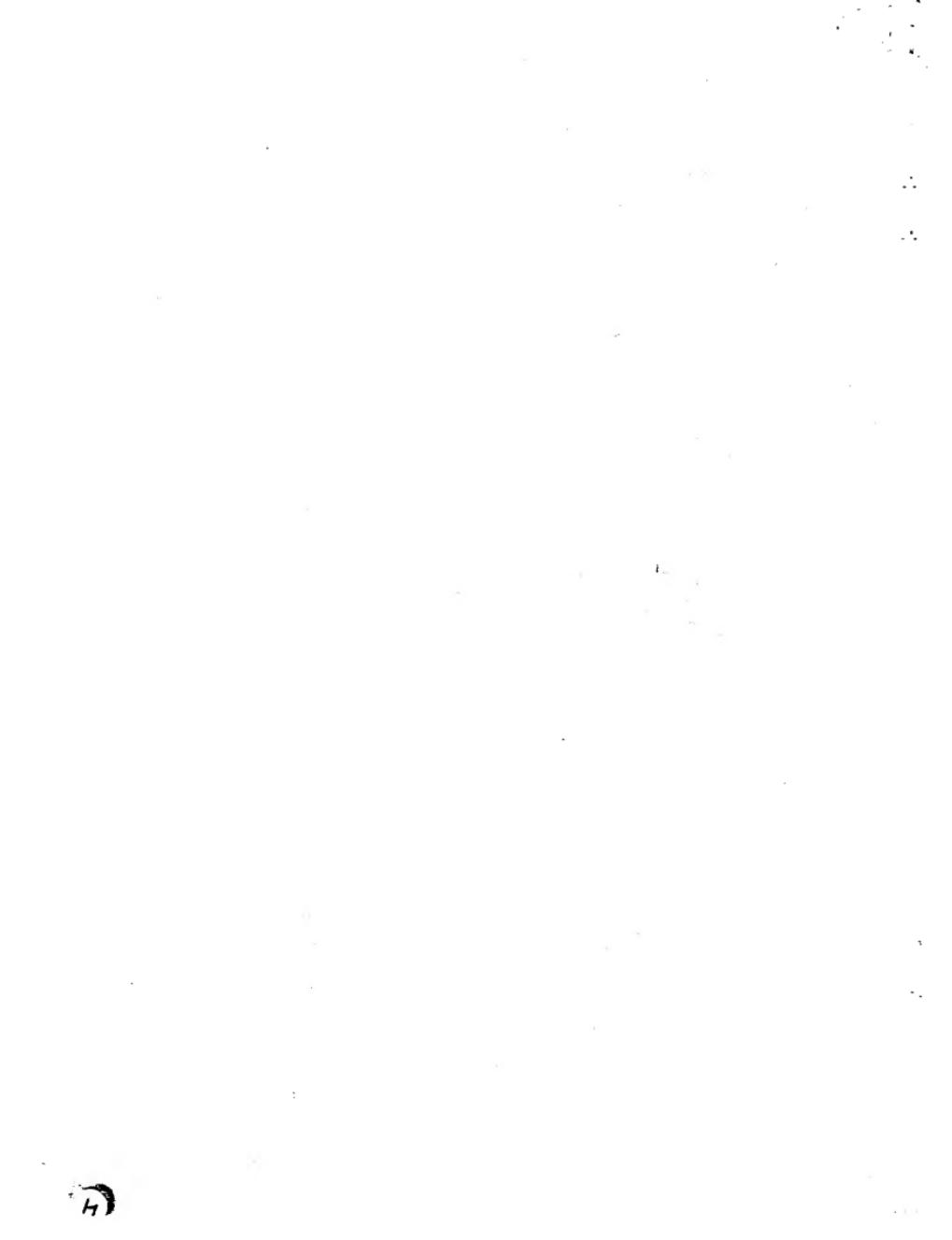


h

Construction plasmide pW3



FIG_2a



3 / 10

POLYMER

Le poly linker du plasmide p-poly III-1 (Lathe et al., Gene (1987) 57, 193-201)

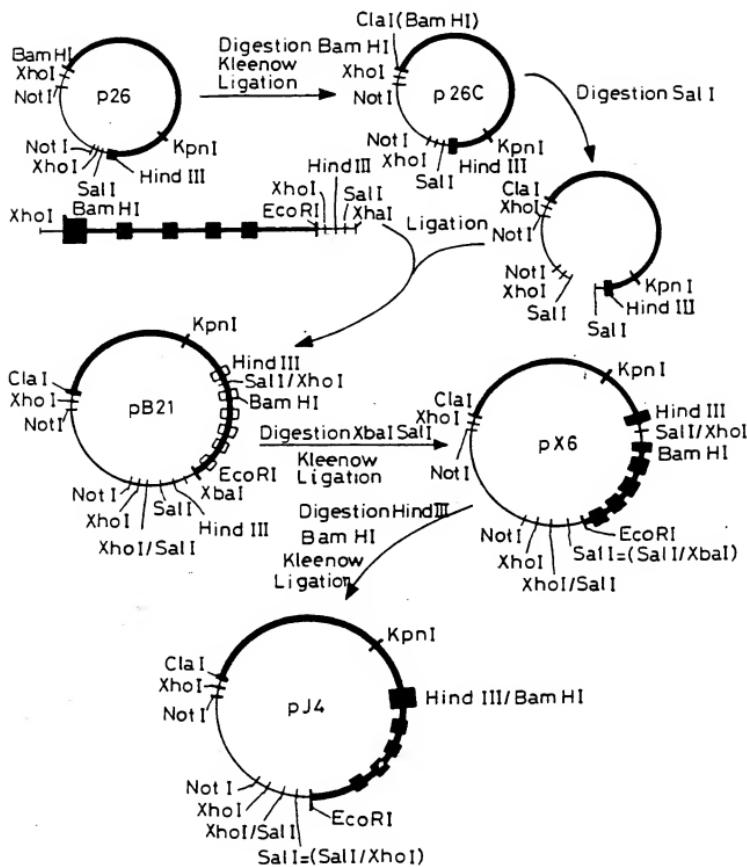
CD
FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIG. 2B

h

4/10

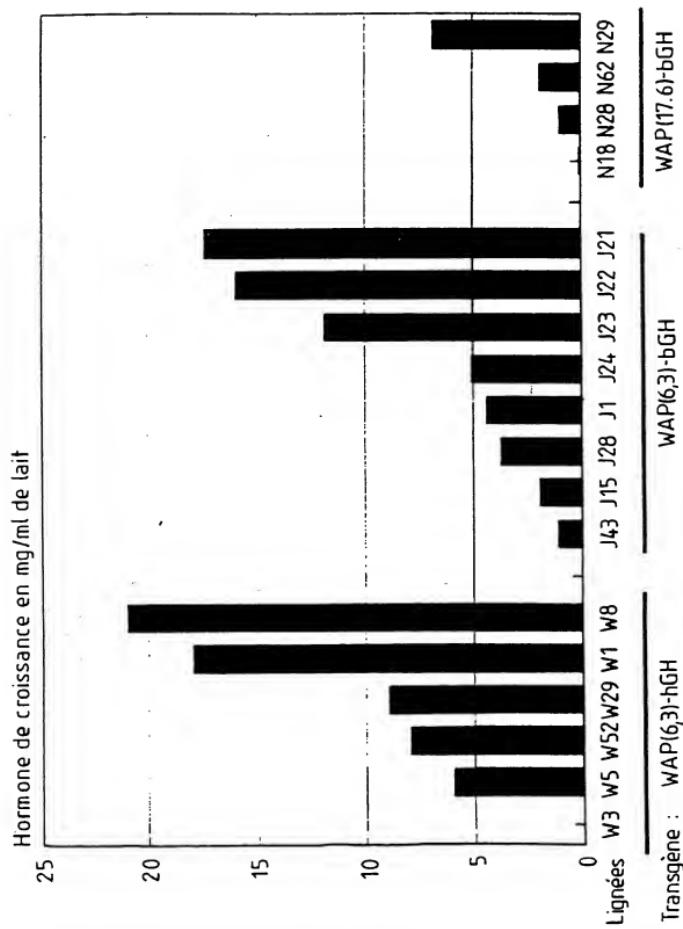
Construction plasmide pJ4



FIG_3

4

FIG_4



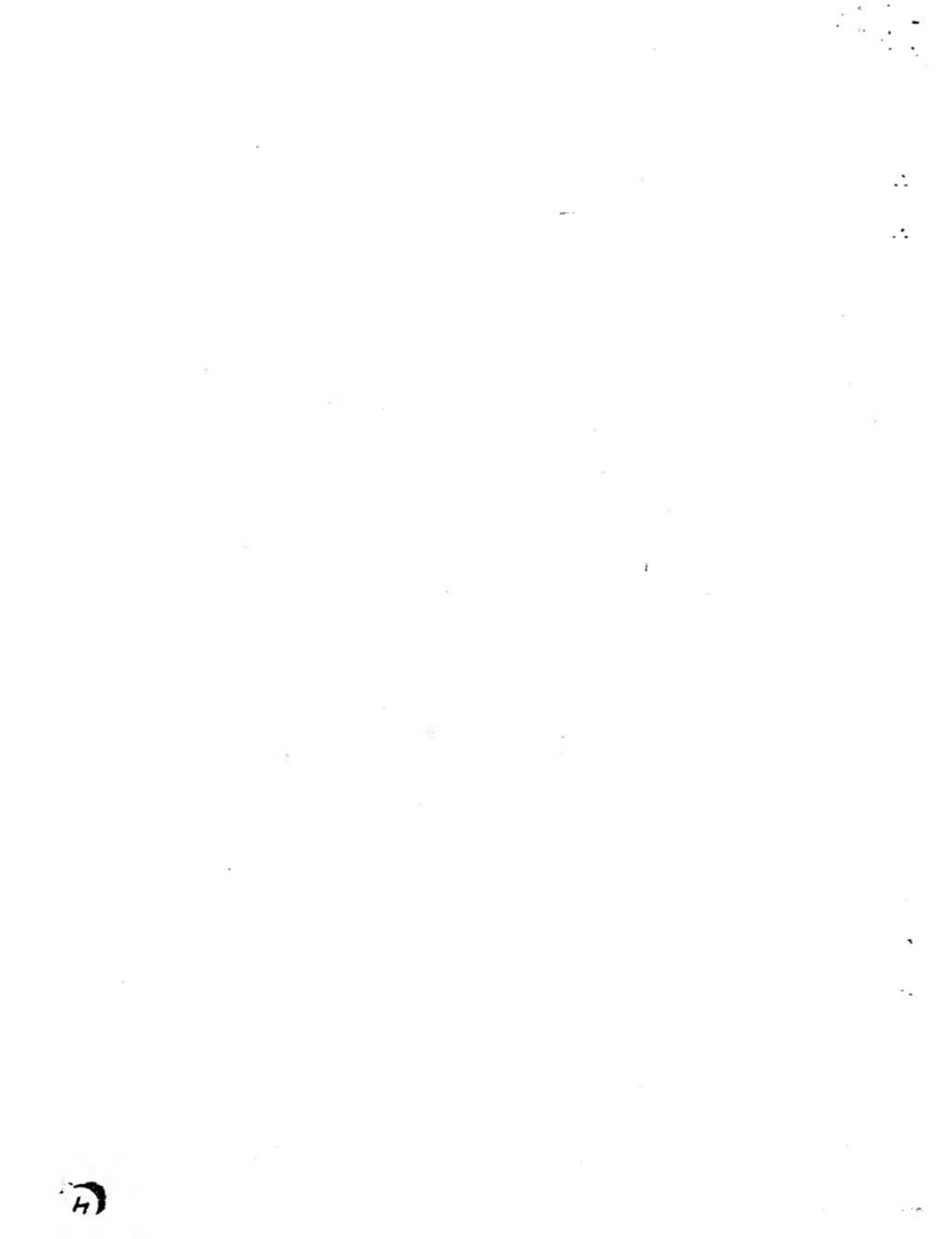
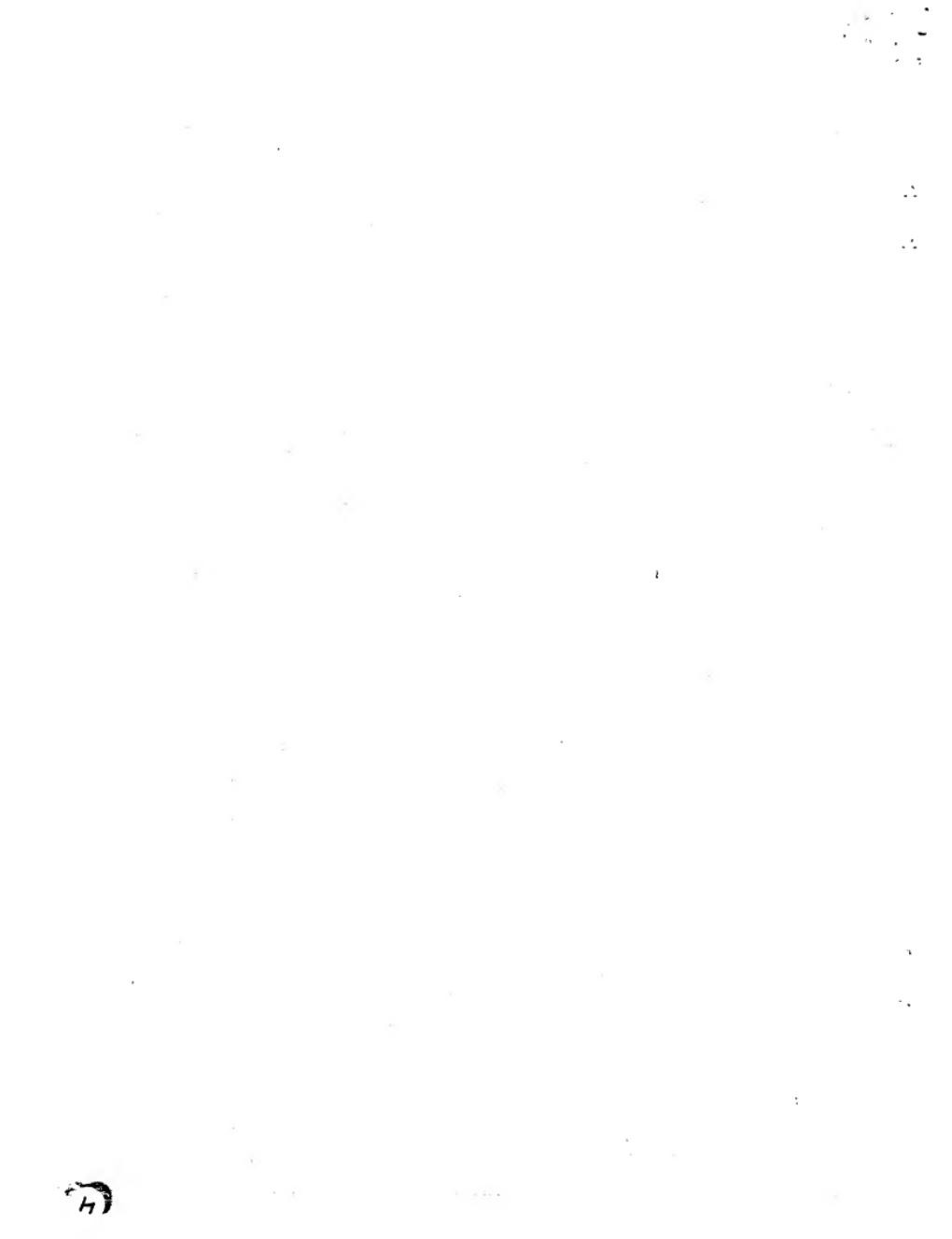
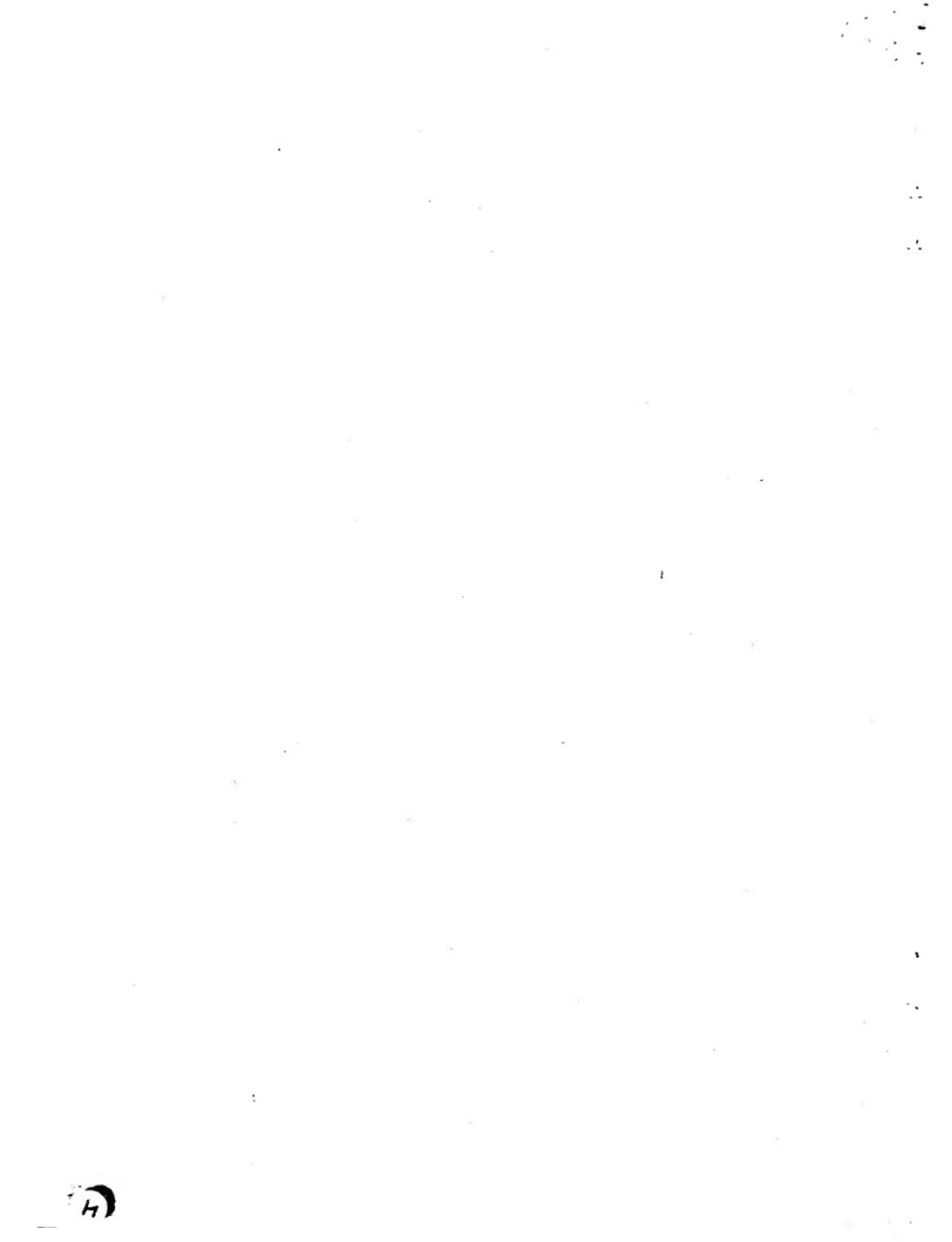


FIG. 5



6/2/10

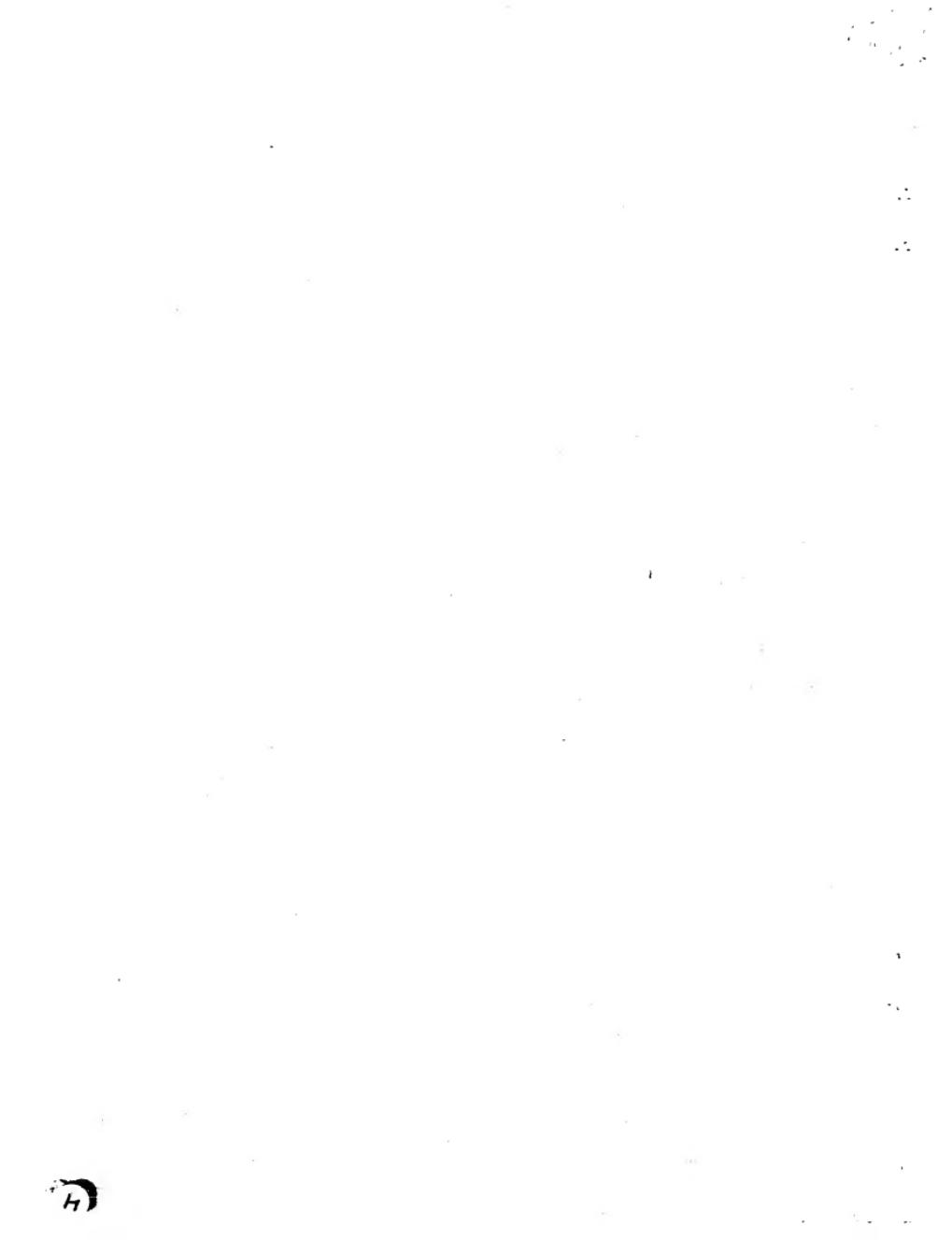
FIG. 5 (SUITE)



7/1/10

FIG. 5 (SUITE)

FEUILLE DE REMPLACEMENT



7/2/10

FIG. 5 (SUITE)

ggggggccacaga9acc4ggc1gacc1c49ggglcccccgccgc1caac1lglcaggggg1l1gggggt 1008
cagggtlggggggggcccalgttacggg1lgacc9aaaaaggcc1gtc1cccggc1c1009

1131 GAG CTC AGC GAC AAC GAC ATC GAG TCC AGG GGC GAC AAG AAG TGC TGC
 1132 Glu Leu Ser Asp -p Cys Ala Asn Asp Ile Glu Cys Arg GIY Asp Lys Lys Cys Cys
 1133 Lys Ala GIY Arg Cys Pro Trp Val Gln A1a Pro Met Leu Ser Glu Leu Cys Glu

h

7/3/10

FIG. 5 (SUITE)

ACT CCC CAG TGAGCCGCCATCCAGGAGTCCTGGCT-GCCAGGAGAGTGGGCCCTGAGTCCTCTCTG 1668
 Thr Pro Gln

 GACCCAGAGCTTGACGGTCCCTGGCTAAATAAACTACTACAGCTTCA 199CTCTGGTGTCT 1719

 gtcctatcgccctggggc-ttggggaaaccaggcgccatggccaaaggccaaaggccatggccatggccaa 1811

 gcaacgacgtccggggaaatggcgatggccatggccaaatggcgatggccatggccatggccatggccaa 1883

 agggggggcaggcggccatccaggatggcgatggccatggccatggccatggccatggccatggccatggcc 1955

 ctgggcttcaglgcccacgaaacccttgcctttccggcgatgcgtggccatggccatggccatggccatggcc 2027

 agcttcaggccatggcgatggccatggccatggccatggccatggccatggccatggccatggccatggccatggcc 2099

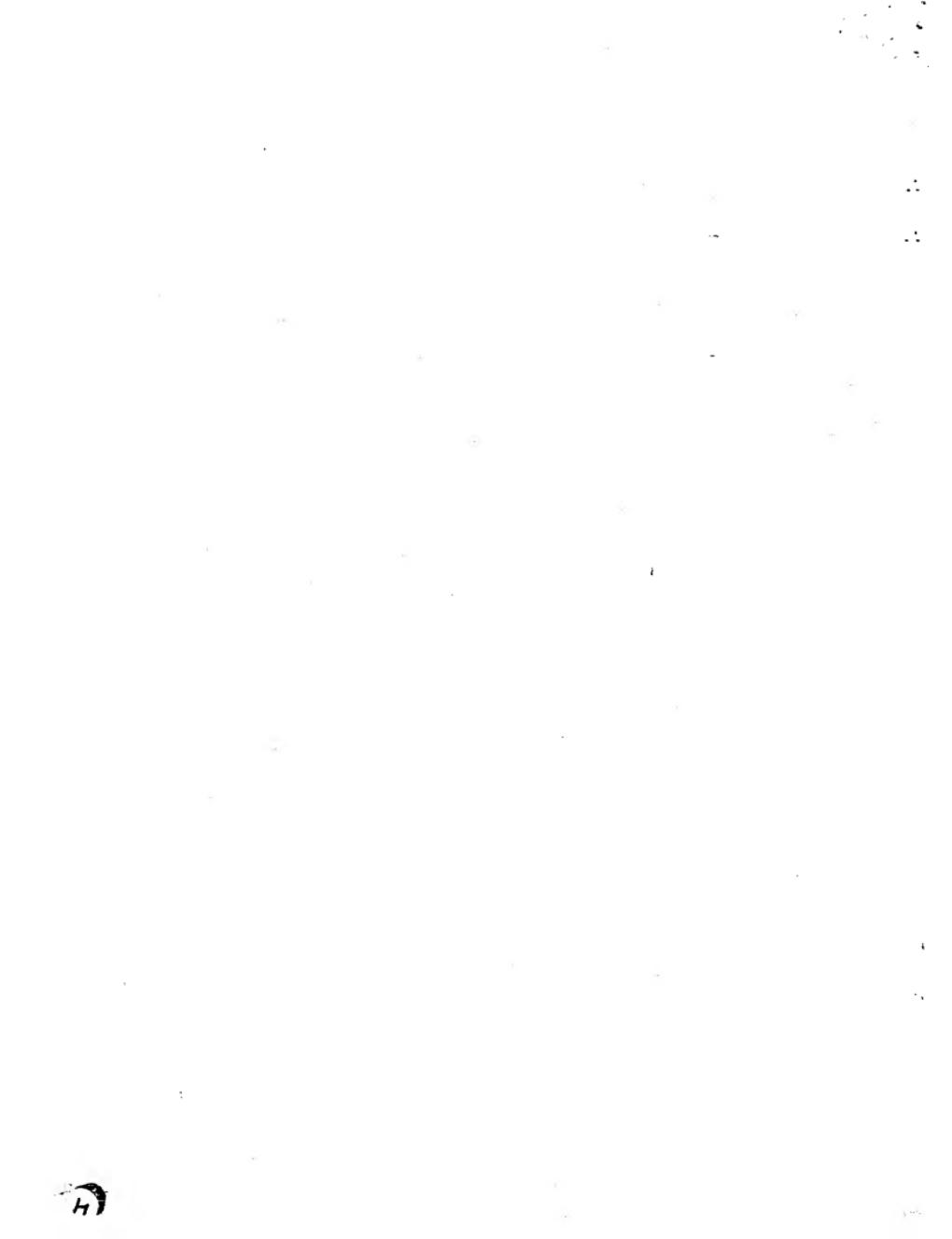
 aggctgtggcc-gggggglgcacagggccatggccatggccatggccatggccatggccatggccatggccatggcc 2171

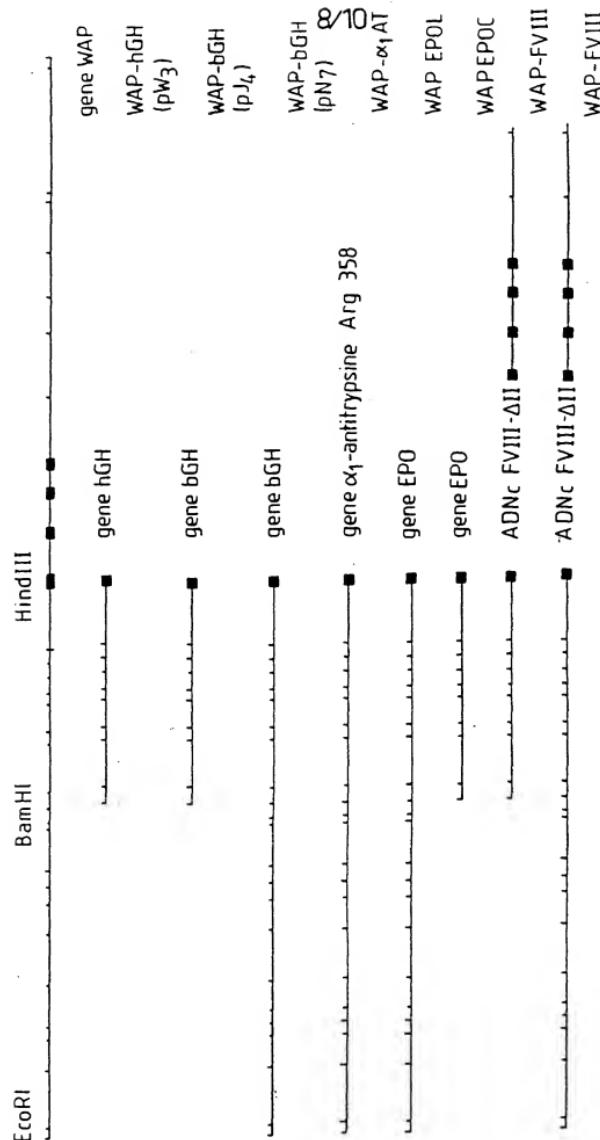
 cccccccaggacaggaggcattgtgc-aggacggccctggccggacgtggatcgccatggccatggccatggccatggcc 2241

 ctgggggttaggggacgtttaggacacac4999ccatggagagcgtggccatggccatggccatggccatggccatggccatggcc 2315

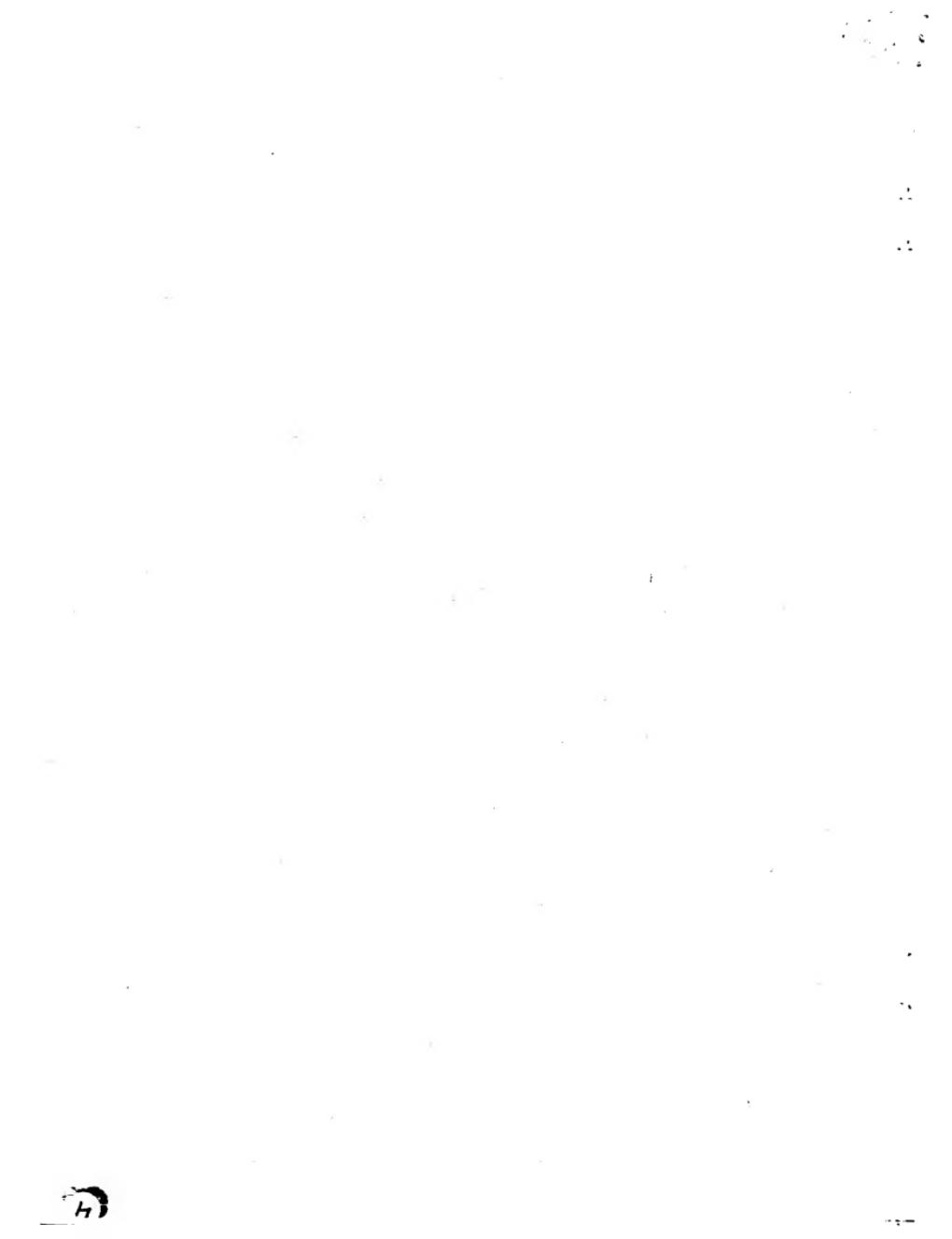
 gacgtggatctggccctcgat 2336

FEUILLE DE REMPLACEMENT



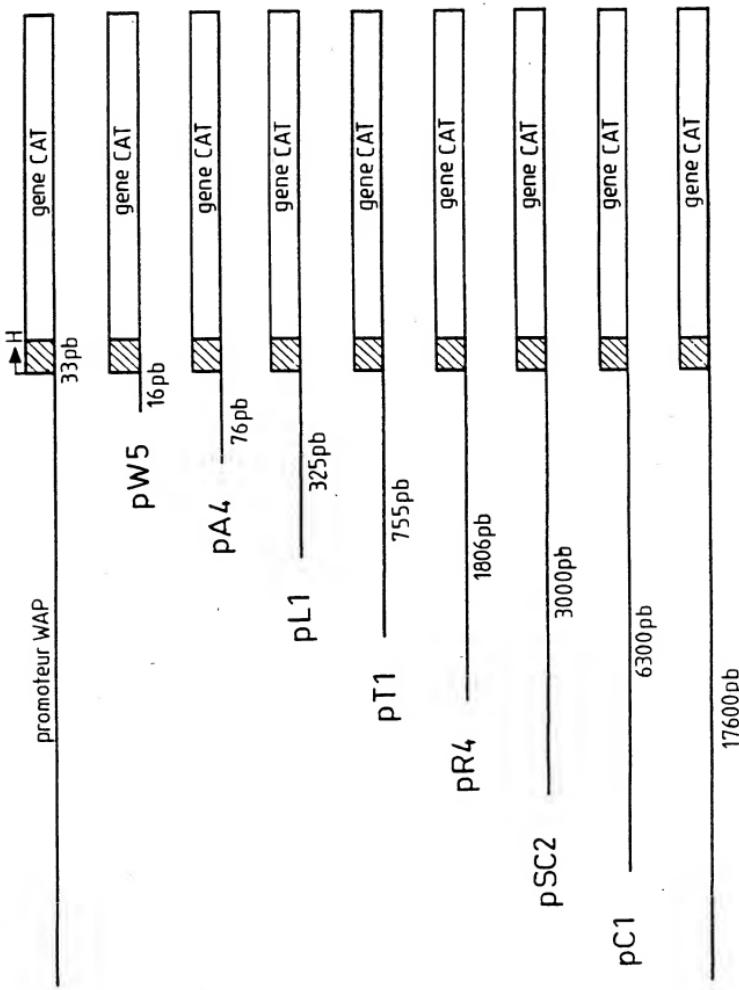


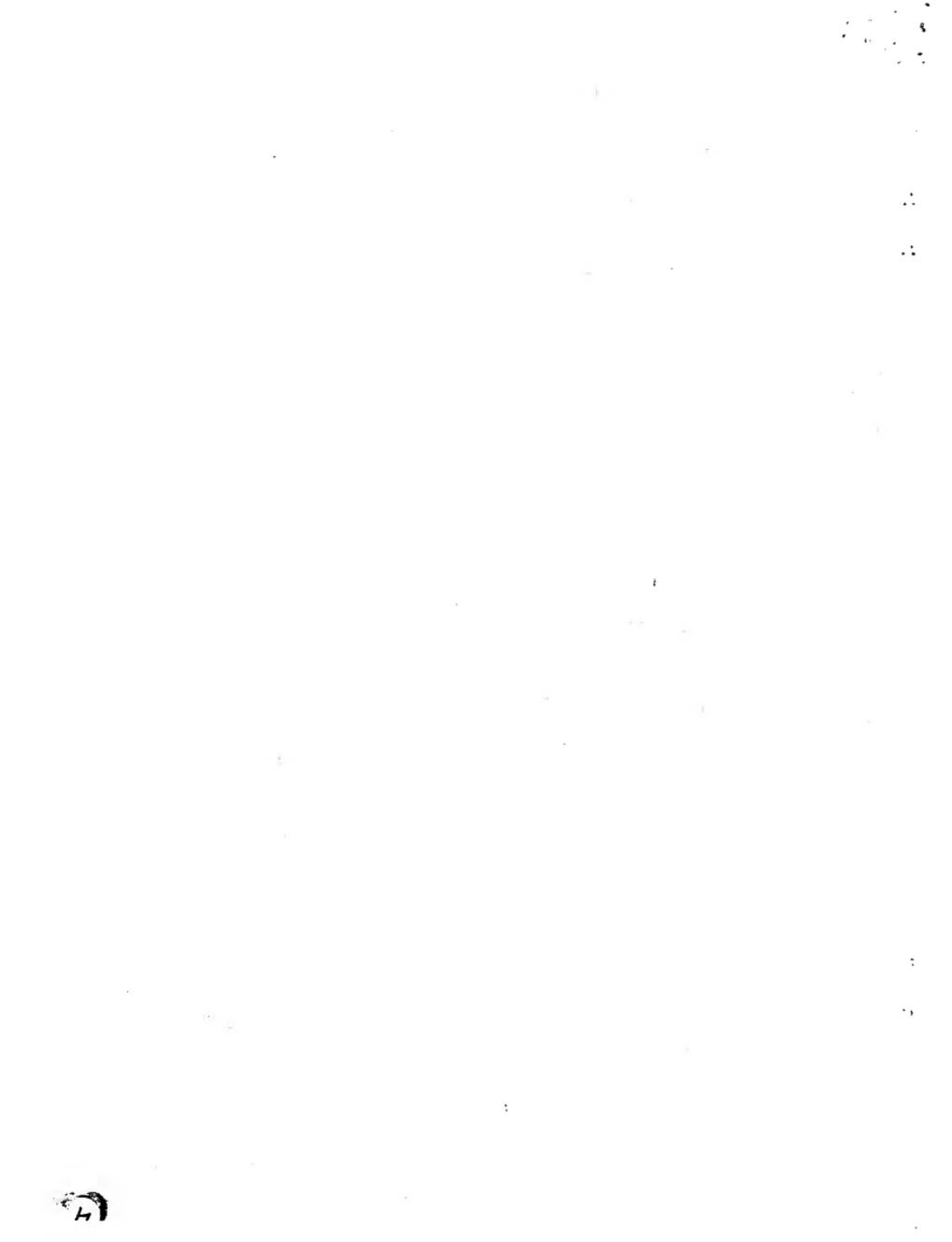
FIG_6



9/10

FIG_7





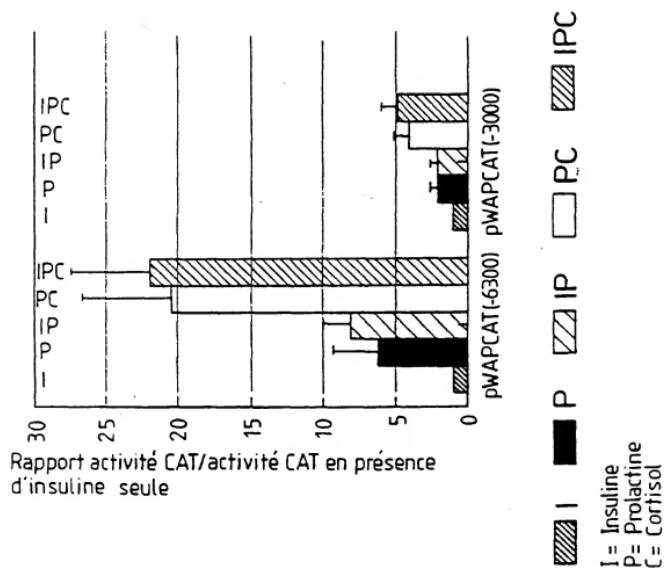
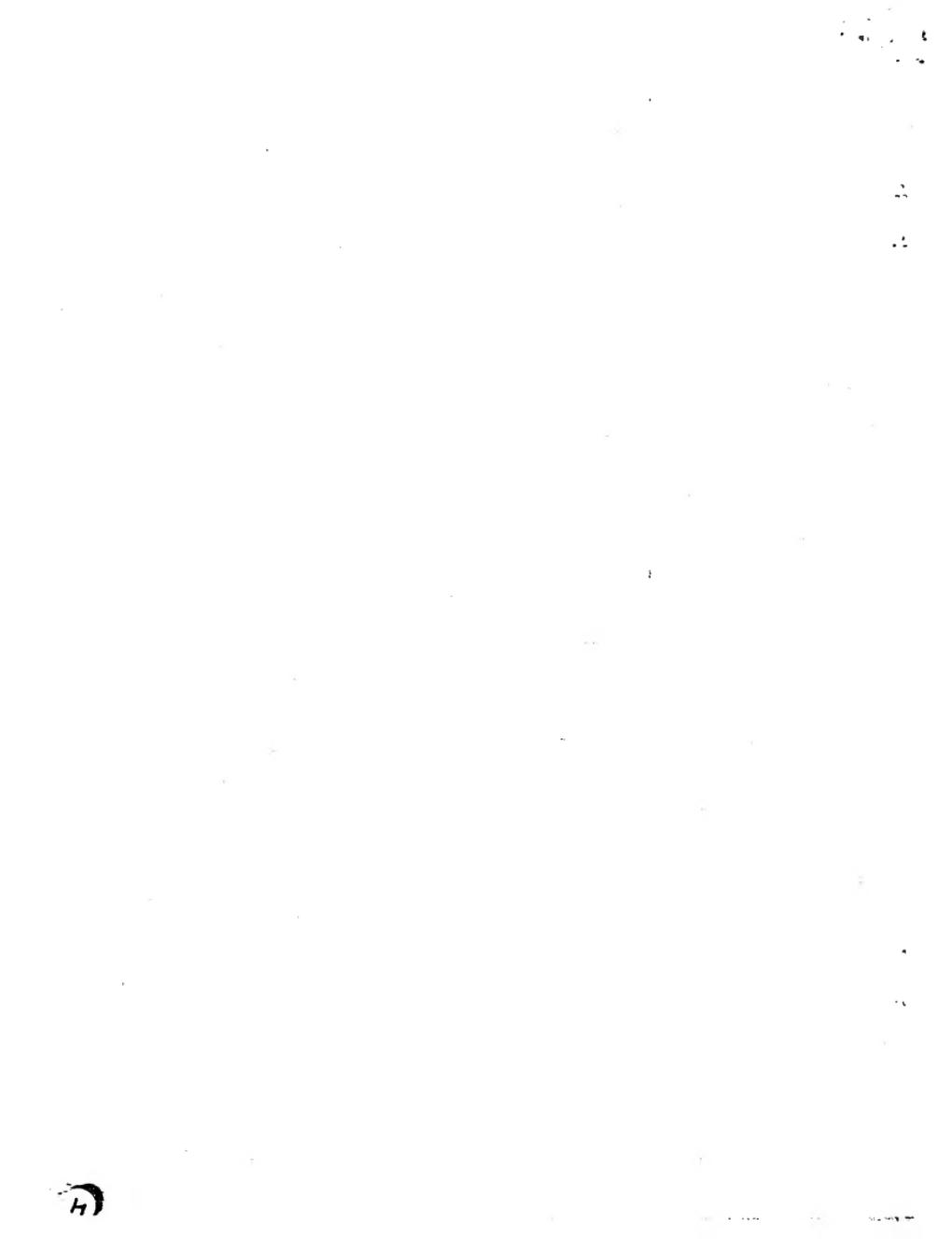


FIG-8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00533

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. 5 C12N15/00; C12N15/85; C12N15/18; C12N5/10; A01K67/027;
 C12N15/12; C07K15/00

According to international Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. 5 C12N; A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, A, 9103551 (TSI-MASON RESEARCH INSTITUTE) 21 March 1991 see the whole document --	1, 7, 12, 16-20
Y	EP, A, 0264166 (INTEGRATED GENETICS, INC.) 20 April 1988 see page 6, line 35 - line 42; claims --	1, 7, 13, 14, 16-20
Y	EP, A, 0279582 (BAYLOR COLLEGE OF MEDECINE) 24 August 1988 see the whole document --	1, 7, 16-20 --

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 August 1992 (12.08.92)

Date of mailing of the international search report

26 August 1992 (26.08.92)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized Officer

Telephone No.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00533

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

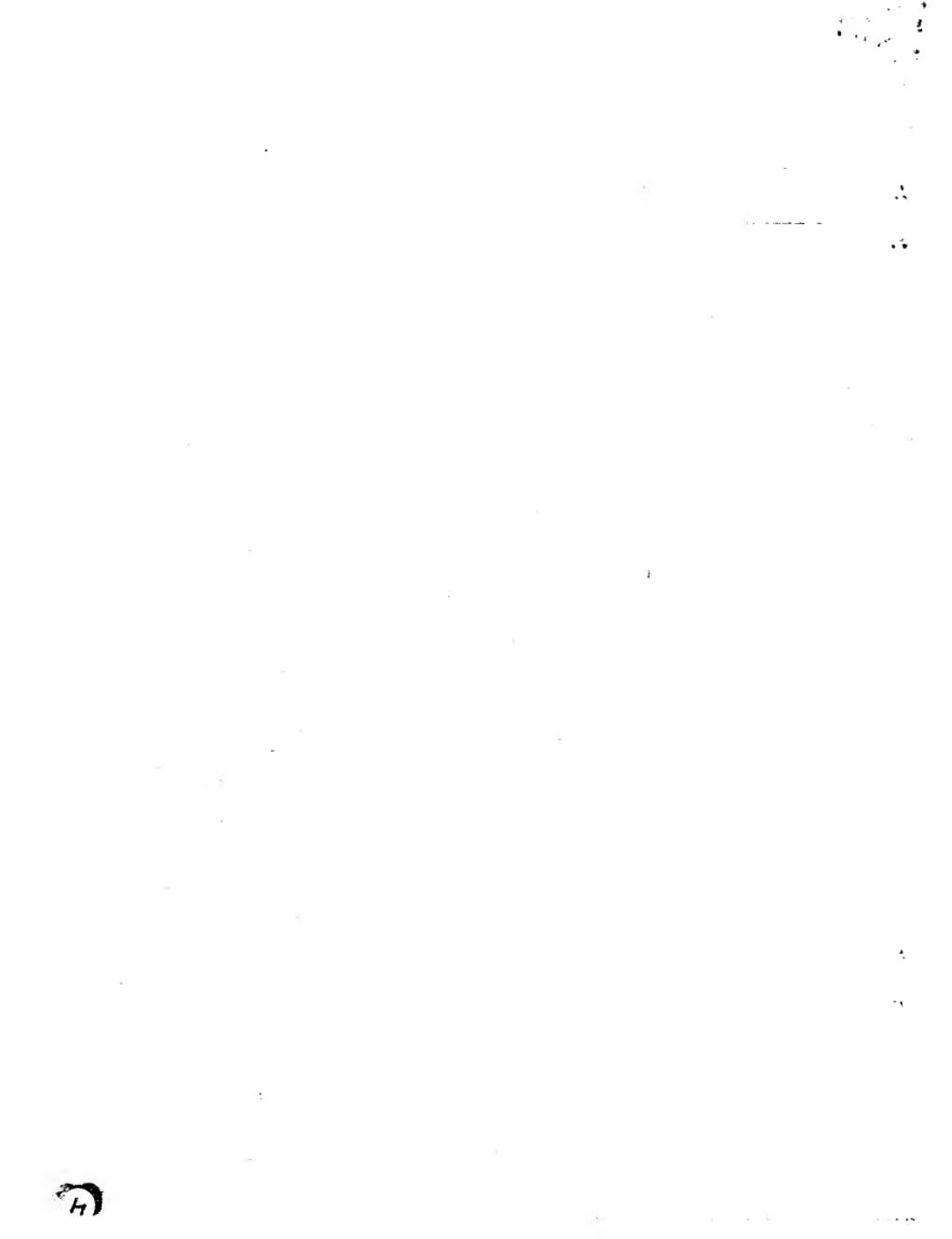
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. Vol. 84, March 1987, WASHINGTON US pages 1299 - 1303; ANDRES, A.C. ET AL.: "Ha-ras oncogene expression directed by a milk protein gene promoter: tissue specificity, hormonal regulation, and tumor induction in transgenic mice" see the whole document	1,7,13, 16-20
Y	BIOTECHNOLOGY Vol. 8, February 1990, NEW YORK US pages 140 - 143; BÜHLER, T.A. ET AL.: "Rabbit beta-casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits" see the whole document	1,7,13, 16-20
Y	CELL BIOLOGY INTERNATIONAL REPORTS Vol. 15, No. 2, February 1991, pages 121 - 129; PUSSANT, C. ET HOUDEBINE, L.M.: "Cortisol induces rapid accumulation of Whey Acid Protein mRNA but not of <i>as1</i> and <i>b</i> -casein mRNA in rabbit mammary explants" see the whole document	1,7, 12-14, 16-20
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH Vol. 16, No. 16, 25 August 1988, ARLINGTON, VIRGINIA US page 8180; DEVINOY, E. ET AL.: "Sequence of the rabbit whey acid protein cDNA" see the whole document	1,7, 12-14, 16-20

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9200533
SA 60384

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 12/08/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9103551	21-03-91	None		
EP-A-0264166	20-04-88	JP-A-	63000291	05-01-88
EP-A-0279582	24-08-88	AU-B-	618524	02-01-92
		AU-A-	1178488	18-08-88
		JP-A-	63309192	16-12-88

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 92/00533

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ?

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N15/00;	C12N15/85;	C12N15/18;	C12N5/10
AO1K67/027;	C12N15/12;	C07K15/00	

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Systeme de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ;	AO1K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹¹ des passages pertinents ¹²	No. des revendications visées ¹⁴
Y	WO,A,9 103 551 (TSI-MASON RESEARCH INSTITUTE) 21 Mars 1991 voir le document en entier ---	1,7,12, 16-20
Y	EP,A,0 264 166 (INTEGRATED GENETICS, INC.) 20 Avril 1988 voir page 6, ligne 35 - ligne 42; revendications ---	1,7,13, 14,16-20
Y	EP,A,0 279 582 (BAYLOR COLLEGE OF MEDECINE) 24 Août 1988 voir le document en entier ---	1,7, 16-20

⁸ Catégories spéciales de documents cités:

- ^{"A"} document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- ^{"B"} document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- ^{"C"} document pouvant poser un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- ^{"D"} document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- ^{"E"} document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- ^{"T"} document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique précédent, mais cité pour compléter la description ou la théorie constituant la base de l'invention
- ^{"X"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- ^{"Y"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne à la matière.
- ^{"Z"} document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 AOUT 1992

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26.08.92

Administrations chargées de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

CHAMBONNET F.J.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁴

(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUE SUR LA DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 84, Mars 1987, WASHINGTON US pages 1299 - 1303; ANDRES, A.C. ET AL.: 'Ha-ras oncogene expression directed by a milk protein gene promoter : tissue specificity, hormonal regulation, and tumor induction in transgenic mice' voir le document en entier ---	1,7,13, 16-20
Y	BIOTECHNOLOGY vol. 8, Février 1990, NEW YORK US pages 140 - 143; BUHLER, T.A. ET AL.: 'Rabbit beta-casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits' voir le document en entier ---	1,7,13, 16-20
Y	CELL BIOLOGY INTERNATIONAL REPORTS vol. 15, no. 2, Février 1991, pages 121 - 129; PUISSANT,C. ET HOUDEBINE, L.M.: 'Cortisol induces rapid accumulation of Whey Acid Protein mRNA but not of <i>as1</i> and <i>b</i> -casein mRNA in rabbit mammary explants' voir le document en entier ---	1,7, 12-14, 16-20
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 16, no. 16, 25 Août 1988, ARLINGTON, VIRGINIA US page 8180; DEVINOY, E. ET AL.: 'Sequence of the rabbit whey acid protein cDNA' voir le document en entier ---	1,7, 12-14, 16-20

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9200533
SA 60384

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 12/08/92.
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9103551	21-03-91	Aucun		
EP-A-0264166	20-04-88	JP-A-	63000291	05-01-88
EP-A-0279582	24-08-88	AU-B- AU-A- JP-A-	618524 1178488 63309192	02-01-92 18-08-88 16-12-88

